

Az állat-egészségügyi célú vakcina-előállítás lehetőségei növények felhasználásával

Irodalmi áttekintés

K. Tombácz – K. Salánki –
Á. Gellért – T. Tuboly –
E. Balázs:

The possibilities of vaccine
production in plants for
veterinary use. Literature review

Tombácz Kata^{1*}, Salánki Katalin², Gellért Ákos³, Tuboly Tamás¹, Balázs Ervin³

1] 1 SZIE-ÁOTK,
Járványtani és
Mikrobiológiai Tanszék.
Hungária krt. 23–25.
H-1143 Budapest.
*E-mail: tombacz.kata@
aotk.szie.hu

2] Mezőgazdasági
Biotechnológiai
Kutatóközpont

3] MTA, Agrártudományi
Kutatóközpont,
Mezőgazdasági Intézet

Összefoglalás. A fertőző betegségek megelőzésének alapvető eszköze az állatorvosi gyakorlatban a specifikus vakcinák kiterjedt és célzott használata. A vakcinafejlesztés az elmúlt évtizedekben látványosan megújult, és ennek a folyamatnak egy lehetséges fejlődési irányát jelenti a növényekben előállított antigének vakcinázási célú felhasználása. A szerzők áttekintést nyújtanak a szűkebb terület eddigi eredményeiről, a már megvalósított és várható kutatási és fejlesztési irányokról. A növényekkel történő antigén-előállítás egyik ígéretes lehetősége az alegységvakcinák gyártásának. Mára számos, állat-egészségügyi szempontból jelentős immunogén fehérje expressziója történt meg transzgenikus növényekben vagy növényeket fertőző vírusvektorok felhasználásával. A növényi expressziós rendszerek előnye a gazdaságosság, valamint az, hogy alkalmasak lehetnek szájon át alkalmazható vakcinák előállítására is.

Summary. Widespread and targeted use of specific vaccines is an essential tool of the prevention and control of infectious diseases in the veterinary practice. Vaccine development went through a spectacular reform during the last decades and one potential direction of this progress is the use of antigens produced in plants for vaccination purposes. The authors provide a summary of the results of this field, about the already accomplished and the expected research and development courses. Antigen expression in plants is a promising possibility for subunit vaccine production. To date, many immunogenic proteins of veterinary importance have been expressed in transgenic plants or using plant virus vectors. Among the advantages of plant expression systems are the possibility of inexpensive production and the potential of oral vaccine application, as well.

**A legtöbb kórokozó
nyálkahártyán
keresztül jut
a szervezetbe**

A fertőző betegségek kórfejlődésében és az ellenük való védekezésben is meghatározó tényező a kórokozó bejutási módja. A bemeneti kapu gyakran valamilyen nyálkahártya felszíne, vagyis a legtöbb kórokozó a légutak, az emésztőcső vagy ritkábban a húgy-nemi szervek nyálkahártyáin keresztül fertőzi az állati szervezetet. Ahhoz, hogy ezeket a felszíneket specifikus védelemben részesíthessük, el kell érni azt, hogy a vakcinázás eredményeképpen a bemeneti kapukban is megjelenjenek az aktív immunválasz termékei (ellenanyagok, aktivált sejtek). Ilyen típusú immunválaszra a parenteralisan adott, ezek közül is különösen az előlt vakcinák esetében nincs mód vagy csak korlátozott védelem várható (32). Mindez azt jelenti, hogy a szisztémásan szaporodó kórokozó ugyan nem vagy csak csökkent mértékben képes klinikai tüneteket kiváltani, de a fertőzést, a helyi szaporodást és ennek következtében a kórokozó ürítését, terjedését a vakcina nem tudja teljes mértékben megakadályozni. Jó védelem csak azokban az esetekben várható, amikor a vakcina lokálisan, a nyálkahártyán indukál immunválaszt,

**Sikeres védelmet
jelenthet
a nyálkahártya-
immunitás**

**A szájon át adható
antigének kutatása
felgyorsult**

amihez társul a szervezet egészét védő szisztémás immunitás. A nyálkahártya-immunitás kiváltása azokban az esetekben lehetséges, amikor az antigénként alkalmazott vakcina eljut a nyálkahártyára és ott az immunválasz felépülésének valamennyi feltételét teljesíti. Ezek a feltételek gyakorlatilag három fő részből tevődnek össze: a) veszélyjelzések szabadulnak ki sérült sejtekből; b) olyan molekuláris mintázatokat hordoz az antigén, ami a nem specifikus védekezési rendszer számára patogén mintázatként ismerhető fel; c) az antigén felismerésére képes receptorokkal rendelkeznek a B- és T-lymphocyták. Ahhoz, hogy mindez teljesüljön, az antigénnek lehetőleg intakt állapotban kell elérnie azt a nyálkahártya-területet, ahol a védelmi rendszer elemei és az antigén kölcsönhatásba léphetnek. A hagyományos vakcinák közül az élő kórokozót tartalmazók azok, amelyek erre képesek, és amennyiben a természetes bemeneti kapujuk a nyálkahártya valamely része, akkor ezt a tulajdonságot kihasználva, helyi immunizálásra (is) alkalmasak lehetnek. A nem élő (inaktivált, alegység-) vakcinák esetén az antigén önmagában rendszerint nem indukál veszélyjelzéseket, és jó eséllyel csak akkor jut el a megfelelő helyszínre, ha kellően nagy adagban van jelen és a nyálkahártyán zajló lebontási folyamatoknak kellőképpen ellenáll. Különösen igaz ez a szájon át (ivóvízben vagy takarmányban) adott antigénekre, vagyis az ún. ehető vakcinákra vonatkozóan. A folyamatosan megújuló és fejlődő állatorvosi vakcina kutatásának egyik célja az orálisan adható antigének fejlesztése (50), legyen szó mezőgazdasági haszonállatok vagy vadon élő állatok immunizálásáról.

A nyálkahártyán alkalmazott vakcinák nem csak a beadás helyén, hanem más szervrendszerekhez tartozó nyálkahártyákon is kiváltják a mucosalis immunitást. Előnyük, hogy a vakcina beadása etetéssel vagy itatással lényegesen kevésbé munka- és eszközigényes, mint az egyedi parenteralis oltás. Az ehető vakcinák hátránya viszont az, hogy a bevitt antigén lebontódhat, megemésztődhet, mielőtt hatását kifejthetné. Ennek elkerülésére számos lehetőség kínálkozik, így növelni lehet az antigén mennyiségét vagy védett, kapszulázott formában kell beadni, mindezek azonban jelentősen növelhetik a módszer költségeit (49). A költséghatékony előállításra és a lebomlás kivédésére egyaránt lehetőséget kínál a vakcinaantigének növényekkel történő előállítása. Az ehető növényekben termelt antigének ugyanis a növényi sejtekben részben védve vannak a bélcsatornában történő lebontástól, ill. kis költségek mellett alkalmasak az antigének tömeges előállítására.

Az antigén-előállítás lehetséges módjai növényekben

Az antigének előállítására a növények két rutinszerűen igénybe vehető lehetőséget is kínálnak. Ezek egyike az idegen antigént kódoló génnek a növényi genomba építése, és az arról történő fehérje-előállítás, vagyis genetikailag módosított, avagy transzgenikus növények létrehozása. A másik módszer nem jár a növényi genom megváltoztatásával, ilyenkor egy, a növényt fertőzni képes vírus hordozza a kívánt antigén kódját, és a gén a fertőzés során jut a vírussal a növényi sejtekbe. Ez utóbbi egy átmeneti (tranzien) expressziót jelent, tehát amíg a vírus a sejtben jelen van és a génekről fehérjeátírás történik, az antigént a növényi sejt szintetizálja. Mindkét változatnak vannak természetesen előnyei és hátrányai is, de abban mindkettő megegyezik, hogy nagy tömegben képes rendkívül olcsón az antigének szintézisére.

Vakcinák előállítására alkalmas növényi rendszerek

A genetikailag transzformált, a kívánt antigént kódoló génről vakcinafehérjét előállító növények nem csak fehérje előállítására használhatók, hanem a vakcinabevitel új módjának is tekinthetők. Megfelelő szabályozó genetikai elemek felhasználásával a vakcinaantigének a növények bizonyos részeiben, pl. a magvakban, gumókban termeltethetők, sőt, fel is halmozhatók. A vakcina-előállítás igényei stabil transzformáció után megegyeznek a mezőgazdasági növényter-

**Növényekbe az anti-
gén beépíthető
– genetikai módosi-
tással,
– növények vírusaival**

mesztés igényeivel, nagyon leegyszerűsítve, a termelés csak termőföldet, vizet és napfényt igényel. A megfelelő antigént (fehérjét) termelő növény termesztése ráadásul helyben is lehetséges, ott, ahol az adott vakcinára igény mutatkozik, például az iparilag kevésbé fejlett országokban is, így a vakcina előállítási és szállítási költségei jelentősen csökkenthetők (61). A növényekben termelt antigének a sejtekben védve vannak a környezet hatásaitól, helyes tárolás esetén az antigén a gabonamagvakban például évekig stabil marad.

Vakcinakutatási és -fejlesztési célokból számos növényfajt tanulmányoztak. A dohánynövény (*Nicotiana*-fajok) az elsőként transzformált növények közé tartozik, toxikus alkaloidoktól mentes változata használható állatok szájon át történő immunizálására. Gyakran transzformált növények a pillangósvirágúak (*Fabaceae* család) tagjai, mert nagy fehérjetartalmú leveleik vagy termésük miatt egyébként is elterjedten használt takarmány- vagy élelmisznőnövények. Ebbe a családba tartozik a lucerna (*Medicago sativa*), a fehér here (*Trifolium repens*), a galambborsó (*Cajanus cajan*), a tehénborsó (*Vigna unguiculata*), a földimogyoró (*Arachis hypogaea*). A gabonanövények magvainak általában nagy a fehérjetartalma és ipari feldolgozásukra kialakult gyakorlat áll rendelkezésre, valamint hosszú ideig tárolhatók. Hátrányuk ezeknek a növényeknek, hogy termesztésük nagy területet igényel, és ezért nehéz azoknak a szigorú szabályoknak a betartása, amelyek megakadályozzák, hogy a transzgenikus növények az élelmiszer- vagy takarmány-előállításra használt növényekkel keveredjenek, kereszteződjenek. A burgonyával (*Solanum tuberosum*) kapcsolatban rendelkezésre állnak hatékony transzformálórendszerek, valamint olyan gumóspecifikus genetikai elemek (promoterek), amelyek segítségével a transzgén terméke a gumóban felhalmozható. A zöldség- és gyümölcsfélék (paradicsom, banán) előnye emberi alkalmazások során az, hogy nyersen is fogyaszthatók, ezért emberek immunizálására is alkalmas vakcinajelöltek. A paradicsom (*Solanum lycopersicum*) esetén rendelkezésre áll termésspecifikus promotor, hátránya azonban, hogy savas kémhatása egyes antigéneket károsíthat. A banánt (*Musa paradisiaca*) a fejlődő országokban kiterjedten termesztik, és mivel vegetatív módon szaporítják, a transzgén elvesztésének a veszélye elhanyagolható. Gyümölcsspecifikus promoterek még nem eléggé ismertek és a gyümölcsstermesztés is drága a gabonatermesztéshez képest (61). A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) az élettudományokon belül sokféle területen elterjedten használt modellnövény, így a gyakran transzformált növények közé tartozik. A libatop nemzetségbe tartozó quinoa (*Chenopodium quinoa*) a gabonák helyettesítésére egyre inkább előtérbe kerül a humán táplálkozásban, nagy fehérjetartalma miatt alkalmas jelölt antigének gyártására, hátránya, hogy a cereáliákhoz hasonlóan fogyasztás előtt ezt is hőkezelní kell.

Transzgenikus expressziós rendszerek

A vakcinaként használni kívánt transzgenikus növények előállításának főbb lépései ma már egy kiforrott technológia részei. Legelőször az erős immunválaszt kiváltó antigént kell kiválasztani. Ezek az antigének a legtöbb állat-egészségügyi jelentőségű kórokozó esetében már ismertek. Az antigén kiválasztása után meg kell tervezni azt a gént, amely tartalmazza az előállítani kívánt antigén genetikai kódját, valamint olyan promoterszekvenciát, amelynek segítségével a fehérjeantigén növényekben nagy mennyiségben szintetizálható. A megfelelő promotor kiválasztása során figyelembe kell venni a transzformálni kívánt növény fajtát/fajtáját, valamint azt, hogy a fehérjét a növényi szervezet mely részében kívánjuk felhalmozni (például az egész növényben, a levelekben vagy a termésben). A promotor azt is meghatározza, hogy a növény fejlődésének mely szakaszában várható a legnagyobb mennyiségű fehérjetermelődés. Előnyös, ha az adott növény fehérjében gazdag részére (mag, gyökérgumó) specifikus promotert használnak, mert az előállított transzgenikus fehérje általában az összfehérje mennyiségének csak töredéke. Széles körben használt promotor a karfiolmozaik-vírus 35S (cauliflower mosaic virus 35S – CaMV35S) promotor, mert erős és tartós

expressziót tesz lehetővé a levélben és a gyökérszövetekben, ugyanakkor ezek a szövetek viszonylag szegények fehérjékben (tömegük 2–5%-a fehérje), ipari mértékű felhasználásuk (vakcinagyártásra) nem gazdaságos (52).

A transzformáció stabil, eredményeképpen a transzgén a sejtmag vagy a kloroplaszt genomjába integrálódik, öröklődése a növény ivaros szaporodása útján a mendeli genetikának megfelelően alakul, ami magában hordozza a kikereszteződés veszélyét, ez hosszú távon elkerülhető homozigóta növények fenntartása révén. A transzformáció egyetlen sejtben történik, majd ebből a transzformált sejtből fejlődik ki a transzgenikus, önálló, teljes növény. A növények egyes sejtjei ugyanis képesek arra, hogy megfelelő biológiai és biokémiai környezetben visszanyerjék totipotenciájukat, „dedifferenciálódjanak” és környezetük további alakításával bizonyos növényi szervek vagy egész növény is kifejlődhet belőlük. Ezt a tulajdonságot használják ki a növények vegetatív szaporítása során is. Az eredeti sejtből kialakult valamennyi sejt hordozza a kiinduló sejt genetikai állományát. A sejtek transzformálására, vagyis a transzgén genomba illesztésére számtalan lehetőség áll rendelkezésre, történhet közvetett vagy közvetlen módszerekkel.

Közvetett transzformáció

A növényi sejtet olyan baktériummal fertőzik, amelybe az antigént integrálták

Közvetett módszer az *Agrobacterium*-közvetítette transzformáció. Az *Agrobacterium* baktériumfajok, például az *A. tumefaciens* vagy az *A. rhizogenes* a növények golyvásodásának kórokozói, daganatszerű képződmények megjelenésével járó betegséget váltanak ki. A tumorszerű képződmények kialakulásáért a baktérium Ti- (tumorindukáló) plazmidja a felelős (68). A baktérium virulenciagénjeit a Ti-plazmid T-DNS nevű szakasza hordozza. A golyvásodás kórfejlődése során a T-DNS a növénysejtek genomjába épül (7), erről szintetizálja a növény a tumorképződést okozó fehérjéket és a baktérium számára fontos nitrogén- és energiaforrásként szolgáló opinok szintéziséhez szükséges enzimeket. A manapság vektorként használt plazmidok olyan T-DNS-t tartalmaznak, amelyek már nem kódolják a daganatos transzformációért felelős fehérjéket, az opinszintézis génjeinek promoterei pedig antibiotikum-rezisztencia gének (pl. kanamicin) expresszióját irányítják, lehetővé téve a transzformált sejtek szelekcióját. A termelni kívánt fehérje génje, megfelelő promoter mögött, a T-DNS-be integrálható (3). A Ti-plazmid olyan virulencia- (*vir*) géneket hordoz, amelyek a vektorból a T-DNS-t a fertőzött növényi sejt genomjába integrálják. A *vir* gént hordozó plazmidok tőlük független plazmidokról is képesek a T-DNS-t a gazda genomjába integrálni, ha azok jelen vannak a baktériumban. A *vir* plazmid és a T-DNS plazmid különválasztásával jönnek létre a bináris vektorok, használatuk és manipulációjuk egyszerűbb, mint a meglehetősen nagyméretű teljes Ti-plazmid esetében (18). A bináris vektor plazmidokat tartalmazó *Agrobacterium*mal fertőzött totipotens növénysejtből stabilan transzformált, a transzgént a genomjában hordozó teljes növény képes regenerálódni. A jól tervezett, ismert restriktációs endonukleáz hasítóhelyeket és erős promotereket tartalmazó, meghatározott szelekciós rendszerekkel rendelkező bináris vektorok széles köre áll rendelkezésre (42).

Közvetlen transzformáció

Az *Agrobacterium*-mediált közvetett transzformáció ma már sok egyszikű és kétszikű növény esetében is megoldott, és ez a leggyakrabban használt transzformációs módszer napjainkban. Korábban az egyszikűek közvetett transzformációja nem működött megfelelő hatékonysággal, ezért fejlesztettek ki közvetlen transzformációs módszereket is. A közvetlen transzformáció esetében nem vesznek igénybe baktériumsejtet a genetikai információ genomba történő beépítéséhez (42). A leggyakoribb közvetlen transzformációs módszer a részecskebombázás vagy biolisztikus transzformáció, amelyet SANFORD és KLEIN fejlesztett ki a növények sejtfalán történő áthatolásra (25, 44). Előnye, hogy genotípustól független, és egyszerre több transzgén is bevihető a növényi sejtbe. A folyamat során a DNS-t kis (0,5–5 µm) átmérőjű hordozórészecskékre, ún. microcarrierekre viszik fel.

**A közvetlen
antigénbevitel
módjai:**

– génpuska,
– elektromos
impulzussal
pórusnyitás
a sejtfalon

Ezek anyaga leggyakrabban arany vagy wolfram, mely biztosítja, hogy az örökítő anyaggal nem lépnek kémiai kölcsönhatásba. A hordozók sejtbe juttatása génpuskával történik. A részecskék felgyorsítására hélium- vagy nitrogéntúlnyomást alkalmaznak (gondoljunk a légpuskákra). A nagy sebességre felgyorsított részecskék képesek a növényi sejtek sejtfalán áthaladni, így a sejtbe jutni (55).

Az elektroporálás, más élőlények sejtjeihez hasonlóan, a növényi sejtekben is alkalmazható a DNS sejtbe juttatására. Az eljárás során egy erős, de rövid ideig tartó elektromos impulzus pórusokat nyit a sejtmembránon, ahol a nagyobb molekulák (plazmidok, fehérjék) bejutnak a sejtekbe. Az elektroporálást kezdetben csak protoplasztokon (leemésztett sejtfalú növénysejt) tudták elvégezni, mára azonban intakt sejteken és növényi szöveteken is alkalmazhatónak bizonyult. Előnye, hogy eszközigénye kicsi és több sejt éli túl, mint a részecskebombázást (47). A módszer egyszerűsége és viszonylagos hatékonysága ellenére kevésbé terjedt el.

A közvetlen transzformációra más módszerekkel is történtek próbálkozások, de ezek egyike sem hozott átütő sikereket. Ilyen módszerek az imbibíció, kémiai módszerek, a pollencső módszer, liposzómák alkalmazása, szilikon-karbin mediált transzformáció és az elektroforézis (42).

Az egész növényi sejthez hasonlóan, a zöld színtestek (kloroplasztok) is transzformálhatók. Ennek előnye, hogy a kloroplaszt DNS-e nagy kópiaszámban van jelen (100/színtest, a zöld levél egy sejtjében pedig akár 100 kloroplaszt is lehet), valamint, hogy kizárólag anyai öröklődése révén a pollenben nem található meg a transzgén, így az ilyen növények esetén a transzgén terjedésének kisebb az esélye. Hátránya, hogy a transzgénről termelt fehérjék zárványokban akkumulálódnak és ilyenkor térszerkezetük is megváltozhat, valamint, hogy a poszttranszlációs módosítások (13) ritkán játszódnak le, feltehetően a kloroplasztizok prokarióta eredete miatt.

A legfontosabb, állatokat megbetegítő vírus- vagy baktériumantigénekkel stabilan transzformált rendszereket az **1. táblázat** mutatja be.

Növényi vírusvektorok alkalmazása

**Növényeket fertőző
vírussal is bevihető
a termeltetni kívánt
antigén**

Növényeket fertőző vírusok felhasználása során a növényi szervezetbe, szisztematikus fertőzés során, genetikailag módosított vírus viszi be az antigén kódját, erről állítódik elő a termelni kívánt fehérje (26). A módszer előnye, hogy nem kell transzgenikus növényt előállítani, ezáltal egy adott rendszer kifejlesztésének ideje jelentősen lerövidül. Az így termelhető fehérje mennyisége több és kisebb az esélye a géncsendesítés jelenség kialakulásának (61). Az átmeneti expresszió lehetőségeit korlátozza, hogy a vírusgenomba építhető idegen gén mérete véges (26). Akár transzgenikus növényi expresszióról, akár pedig egy növényi vírusvektor által bevitt gén expressziójáról van szó, minden esetben kizárólag alegységvakcina előállítása lehetséges. Az alegységvakcinára jellemző, hogy ellentétben a hagyományos attenuált vagy inaktivált vakcinákkal, nem tartalmazza a kórokozó teljes antigénkészletét, hanem annak csak egy részét (alegységét), természetesen éppen azt, ami a protektív immunitás kiváltásáért felel. Ez az alegység lehet egy teljes fehérje az eredeti kórokozóból, lehet azonban annak egy rövidebb szakasza, antigéndeterminánsa (epitópja) is. Vakcinázásra az antigéndetermináns természetesen csak akkor alkalmas, ha a bevezetőben felsorolt három feltétel teljesül, ráadásul nem elegendő az, hogy immunválaszt indukáljon, az is elengedhetetlen, hogy ez az eredeti kórokozóhoz mérten rendkívül szűk szakasz olyan immunválaszt indukáljon, ami a kórokozóval szemben megfelelő védelmet nyújt. A vírusvektorok alkalmazása esetén előnyös, ha sikerül egy kórokozó elleni protektív immunitást ilyen expresszálandó epitóp(ok)ra leszűkíteni. A vírusvektorok estén ugyanis, bár megoldható, hogy a vírusgenom egy teljes idegen gént tartalmazzon, ennek a stabilitása a genomon belül nem minden esetben tökéletes, a vírus replikációja során megszabadulhat a bevitt géntől (30). A stabilitás szempontjából előnyösebb a helyzet, ha nem a tel-

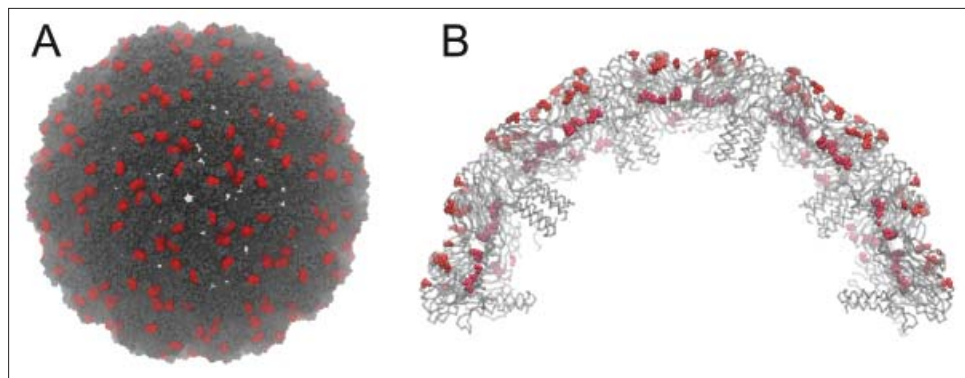
**Transzgenikus úton
vagy
vírusvektorral bevitt
gén expressziója
révén csak
alegységvakcina
állítható elő**

1. táblázat. Állat-egészségügyileg jelentős, stabilan előállított antigének
Table 1. Stable expressed antigens of veterinary importance

Kórokozó	Antigén	Növény, növényi rész	Transzformálás módja	Hivatkozás
Szarvasmarha vírusos hasmenése vírusa	tE2 fehérje	dohánylevél		36
Szarvasmarha rotavírusa	VP6	burgonyagumó, -levél		33
	eBRV4	lucernalevél		63
Veszétség vírusa	veszétség glükoprotein (rabies glycoprotein – RGP)	paradicsomlevél, -termés		34
	veszétség nukleoprotein (rabies nucleoprotein – RNP)	paradicsomlevél, -termés		39
Baromfipestis vírusa	fúziós fehérje (F-protein)	rizslevél, -szem		66
Keleti marhavész vírusa	hemagglutinin	dohánylevél		22
		földimogyoró-levél	Agrobacterium-mediált	23
		galambborsólevél		45
Sertések transzmisszibilis gastroenteritis vírusa (transmissible gastroenteritis virus – TGEV)	spike-protein	lúdfülevél		14
		burgonyagumó		15
		dohánylevél		54
Ragadós száj- és körömfájás vírusa (foot and mouth disease virus – FMDV)	VP1 fehérje	lúdfülevél		4
		lucernalevél		9
Nyulak vérzéses betegségének vírusa (rabbit haemorrhagic disease virus – RHDV)	VP60 fehérje	burgonyalevél, -gumó		5
Mannheimia haemolytica A1	leukotoxin (Lkt)	fehérherelevél		28
Bacillus anthracis	protektív antigén	dohánylevél		2
	protektív antigén epitóp	dohánylevél		16
		dohány zöld színtestje	biolisztikus	
Clostridium tetani	TetC antigén	dohány zöld színtestje		53
Bluetongue-vírus	VP2 fehérje	földimogyoró embrionális sejtkultúrája	biolisztikus	1
Kiskérődzők pestise vírus	hemagglutinin-neuraminidáz-komplex	galambborsó		41
Japán encephalitis vírusa	envelope protein	rizsszem	Agrobacterium-mediált	60
Fertőző bronchitis vírusa	spike-protein	burgonyagumó		69
Sertések légzőszervi és reprodukciós szindrómája vírusa (porcine respiratory and reproduction syndrome virus – PRRSV)	mátrixfehérje	kukoricakallusz	biolisztikus	19

jes idegen gén, hanem csak a fontos epitóp kódja kerül inszercióra. Ilyenkor lehetőség nyílik arra is, hogy ezt az epitópot a növényi vírus a felszínén valamelyik fehérjében jelenítse meg, pl. egy, a növényvírus életciklusa számára nélkülözhető epitóp idegen epitópra történő cseréjével vagy, az eredeti fehérjeszerkezet megőrzése mellett, megfelelő pozícióba illesztjük a beépíteni kívánt epitópot (**ábra**).

Ismert, hogy a ragadós száj- és körömfájás vírusának (foot and mouth disease virus – FMDV) kapszidja négyféle fehérjéből épül fel. Ezek közül az egyes számú (viral protein 1 – VP1) hordozza a protektív immunitás kialakulásáért felelős legfontosabb epitópokat, ezért az FMDV alegységvakcina-kutatások középpontjában leggyakrabban ez a fehérje áll (65). A teljes VP1 fehérjét dohánymozzaikvírus-vektor segítségével expresszálták. A vírussal fertőzött



Ábra. Az uborkamozzaik-vírus (*cucumber mosaic virus – CMV*) virionjának molekuláris felszíne (A) és részleges keresztmetszeti képe (B)

Piros golyókkal jelöltük azokat az aminosavakat (58), amelyek helyére idegen eredetű vírus epitóp szekvenciákat lehet úgy beépíteni, hogy közben a CMV fertőzőképes marad a gazdanövényen. A keresztmetszeti (B) ábrán jól látszik, hogy kétféle, hatékonyan bizonyuló beépítési pont létezik: az egyik a virion külső, míg a másik a virion belső felszínén helyezkedik el

Figure. Molecular surface (A) and partial cross-section (B) illustrations of the Cucumber mosaic virus (CMV) virion

Red orbs indicate amino acids (58) which can be replaced by viral epitopes of foreign origin, without loss of CMV infectivity on host plants. Two effective insertion points are clearly visible on the cross-section figure (B), one on the outer and one on the inner surface

A kórokozónak az immunitásért felelős epitópjai is megfelelő immunválaszt keltene

Bi- vagy polivalens alegységvakcinák is előállíthatók

dohány-növény kivonatával immunizált egerek ellenálltak a kísérleti FMDV-fertőzésnek (62). A VP1 fehérje egy 37 aminosav hosszúságú szakaszát, amelyen megtalálható a vírus sejtbe jutását elősegítő epitóp, bambuszmozaik-vírus (bamboo mosaic virus – BaMV) vektor segítségével expresszálták dohányban és libatopban. A fehérjével sertéseket immunizáltak és a termelő ellenanyagok hatékonyságát ráfertőzéses kísérletben igazolták (65). Ezek alapján úgy tűnik, hogy e kórokozó esetében nincs szükség a teljes VP1 fehérjére a megfelelő védelem kialakításához, elegendőnek bizonyulhat a rövidebb, de megfelelően kiválasztott epitóp is. Ez nem csak a rekombináns vírus stabilitása szempontjából lehet jelentős, hanem több hely maradhat a vektoron egyéb, akár más kórokozókból származó epitópok vagy adjuváns hatású fehérjék együttes expressziójára, bi- vagy polivalens alegységvakcinák előállításához.

Ugyanabból a kórokozókból származó, de két különböző epitóp ko-expressziójának is lehet gyakorlati jelentősége, például a veszettség elleni védekezés esetében. A háziállatok vakcinázására inaktívált veszettségvírust tartalmazó vakcinákat használnak, a vadon élő állatok orális immunizálására pedig helyenként rekombináns, vacciniavírus alapú, élő, csálétekben kihelyezett vakcinákat alkalmaznak. A veszettség vírusa ellen kialakuló immunitásban két antigén játsza a legfontosabb szerepet: a G-protein (rabies glycoprotein – RGP), amely ellen a neutralizáló ellenanyagok termelődnek, és a nukleoprotein (rabies nucleoprotein – RNP), ami a T-sejtek aktivációjáért felelős. Az inaktívált vakcinák mindkét antigént tartalmaznak, a rekombináns vakcina csak az RGP-fehérjét. Dohány- és lucernamozzaik-vírusokban olyan kimérikus fehérjét állítottak elő, ami az RGP és az RNP egyes, immunogenitás szempontjából jelentős, 22 és 14 aminosav hosszúságú szakaszaiból áll. A fertőzött növények kivonataival etetett egerek ellenálltak a veszettségvírussal történő kísérleti fertőzésnek (67).

A kettes típusú sertéscircovírus (porcine circovirus type 2 – PCV2) nagy gazdasági jelentőségű, világszerte előforduló kórokozó, Magyarországon szinte a teljes sertésállományban jelen van. A PCV2 elleni védekezés jelenlegi módszere a kocák vagy a süldők vakcinázása. Sejttenyészeteken nehezen szaporítható vírus, ezért az inaktívált vakcinák gyártása költséges, így gazdaságosabb alternatívát jelent az alegységvakcinák előállítása. Számítógépes modellezés alapján kiválasztott, a protektív immunitás kialakításáért feltehetően felelős, 10 aminosav hosszúságú

Már több, nagy jelentőségű állatbetegség ellen sikeresen termeltettek növényekkel antigéneket

PCV2 epitóp uborkamozzaik-vírus vektor alapú expressziójával olyan vakcinajelölt készült, ami egér- és sertésoltási kísérletben PCV2-specifikus ellenanyag termelését váltotta ki. A vakcina tervezése során még nem volt ismert a PCV2 kapszidfehérje térszerkezete. Ezért először fehérjeszerkezet-predikciós módszerekkel előállították a PCV2 kapszidfehérje modelljét. Ezen a modellen könnyen azonosíthatóvá váltak azok a peptidszekvencia-részek, amelyek potenciálisan képesek lehetnek az immunválasz kiváltására. Időközben a PDB fehérjeszerkezeti adatbázisban megjelent a PCV2 virion térszerkezete, amit röntgendiffrakciós módszerrel határoztak meg (24). A predikció helyességét jól igazolja az, hogy a kiválasztott hatékony epitóp valóban a kísérletileg meghatározott virion felszínén helyezkedik el. A növényvírus-vektorok felhasználásával előállított, állatorvosi szempontból jelentős antigéneket a **2. táblázat** mutatja be.

További expressziós lehetőségek és fejlesztési irányok

A kutatások tovább folynak

A növényvírusokkal történő transzfekció mellett más lehetőség is rendelkezésre áll az átmeneti expresszió létrehozására: ez az agroinfiltráció. Hasonlóan az *Agrobacterium*-mediált stabil transzformációhoz, itt is a baktériumban lévő bináris plazmidba ültetett transzgénről történik az expresszió. A baktériummal nem egy sejtet fertőznek, amiből aztán később egy teljes növény alakul ki, hanem egy növény már differenciált részét, leggyakrabban a levelét. Ennek során a T-DNS a növénysejt citoplazmájába jut, de nem épül be annak genomjába, fehérjeátírás viszont átmenetileg így is történik róla. Így az átmeneti expresszióra jellemzően gyorsan kifejleszthető a rendszer és a transzformációhoz viszonyítva, nagy fehérjehozam érhető el, rövidebb ideig. Az agroinfiltráció során a leveleket *Agrobacterium* szuszpenziójával infiltrálják vákuum vagy nyomás segítségével (21). A módszer még nem alkalmas ipari mértékű rekombináns fehérje előállítására,

2. táblázat. Különböző növényvírus-vektorok segítségével előállított kórokozó alegységantigének
Table 2. Antigens expressed by plant virus vectors

Kórokozó	Antigén	Növény	Vektor	Hivatkozás
Ragados száj- és körömfájás vírusa (foot and mouth disease virus – FMDV)	VP1 fehérje fragmentum	tehénborsólevél	tehénborsómozzaik-vírus (cowpea mosaic virus – CPMV)	56
	teljes VP1 fehérje	dohánylevél	dohánymozzaik-vírus (tobacco mosaic virus – TMV)	62
		libatop, dohánylevél	bambuszmozzaik-vírus (bamboo mosaic virus – BaMV)	65
Veszettségvírus	RGP és RNP kimérafehérje	dohánylevél, spenótlevél	TMV	35
		dohánylevél, spenótlevél	lucernamozzaik-vírus (alfalfa mosaic virus – AIMV)	67
Sertések járványos hasmenése vírus (porcine epidemic diarrhea virus – PEDV)	COE	dohánylevél	TMV	20
Kutyaparvovírus	VP2 epitóp	dohánylevél	szilvahimlővírus (plum pox potyvirus – PPV)	10
		tehénborsólevél	CPMV	27 37
Nyércenteritis-vírus	VP2 epitóp	tehénborsólevél	CPMV	8
RHDV	VP60	dohánylevél	PPV	11
<i>Bacillus anthracis</i>	lethalis faktor 1-és doménje	dohánylevél	TMV	6
Szarvasmarha-herpeszvírus 1 (bovine herpes virus 1 – BHV1)	glikoprotein D	dohánylevél	TMV	40
Klasszikus sertéspestis vírusa	E2 protein	dohánylevél	potato virus X	31

**A nyálkahártya
immunválasza
erősíthető fúziós
fehérjék
(toxinalegységek)
alkalmazásával**

ám ez az új eljárás folyamatos fejlesztés alatt áll, például egyes géncsendesítés-szupresszorok ko-expressziójával a hozam ötvenszeresére volt növelhető (59).

Főleg a mucosális vakcinák immunogenitását képes növelni, ha fúziós fehérjeként az antigénhez kapcsolva, attól egy rövid összekötő szakasszal elválasztva, a *Vibrio cholerae* baktérium cholera toxinjának B alegységét (CTB) is expresszálják. Ez az alegység felelős ugyanis a toxin specifikus kötődéséért és a toxin bélhámsejtekbe jutásáért, viszont önmagában nem váltja ki a teljes toxinra jellemző hatást (48). Hasonló felépítésű és működésű az *Escherichia coli* hőlabilis enterotoxinjának B alegysége (LTB) (57). CTB-hez kapcsolva sikeresen expresszáltak veszettségvírus-glükoproteint stabil transzformáció segítségével, dohányban (51). LTB-vel együtt expresszálták a sertések járványos hasmenése vírusának (porcine epidemic diarrhea virus – PEDV) egy neutralizációs epitópját transzgenikus rizsszemekben. A fúziós fehérje képes volt a bélnyálkahártyára jellemző GM1 gangliozidreceptorokhoz való kötődésre (38). Alkalmasnak bizonyulhat még a nyálkahártya immunválaszának erősítésére a *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxinja is, ugyanis a toxin N-terminálisán olyan alfa-helikális szerkezetű domén található, amely nagy affinitással rendelkezik a sejtmembránok iránt. Az alfa-hélixek egyes aminosavainak diftériatoxin-epitóppra cserélése jelentősen nem változtatta meg a toxin biokémiai tulajdonságait, viszont képes volt egér orrnyálkahártyájára oltva, a diftériatoxinra specifikus ellenanyag termelését indukálni (17).

A flagellin antigének meglehetősen konzervált molekulák a Gram-negatív baktériumok körében. Olyan, patogénasszociált molekuláris mintázatokkal rendelkeznek, amelyeket az epitheliális sejtek és a dendritikus sejtek membránján lévő toll-like receptorok (TLR) képesek felismerni. A TLR aktivációja végül a nem specifikus és közvetett módon az adaptív immunválasz beindulásához vezet. *Salmonella typhimurium*-ból származó flagellint expresszáltak dohányban, és az így előállított flagellinnel keverve, adjuválni lehetett a szájon át adott ovalbumin által kiváltott immunválaszt egerekben (12).

**A növények
anyagcseretermékei
is adjuválo hatásúak
lehetnek**

A növényekben történő vakcina-előállítás egyik előnye, hogy nem feltétlenül szükséges külön adjuválo molekulákat szintetizálni, hiszen számos növény termel olyan immunmoduláló hatású anyagcseretermékeket, amelyek adjuválo hatásúak lehetnek a szájon át alkalmazott vakcinákra. Ilyen molekulák az egyes növényi poliszacharidok, szaponinok, flavonoidok, alkaloidok, fenolok (29).

Amennyiben mégis szükséges az immunválasz segítése vagy az irányának a kijelölése, úgy mód van az immunogén epitópok citokinekkal együtt történő expressziójára. Egyes interleukineket már sikeresen expresszáltak növényekben úgy, hogy azok funkciójukat megtartották. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az antigéneket citokinekkal együtt expresszáva, az immunválasz erősíthető vagy akár a Th1-sejtes válasz irányába eltolható (46).

A növényekben előállítható, gyógyászati célra használható molekulák nem csak antigének vagy adjuvánsok lehetnek, az expressziós rendszereket alkalmazni lehet más biológiai funkciójú fehérjék gazdaságos előállítására is. Ezek lehetnek például monoklonális ellenanyagok, terápiás célra használt enzimek, egyes vérfehérjék, növekedési faktorok és hormonok (64).

**A növényekkel más,
biológiai
hatású fehérjék is
termeltethők**

A növényi szervezetekben, termőföldön megvalósuló antigéngyártás az expressziós rendszerek és az epitópazonosítás fejlődésével napjainkban már megvalósítható, azonban a termesztés–termelés gyakorlati beindulása még, elsősorban technológiai nehézségek miatt, várat magára. A növény szervezetében lévő antigénnek felhasználás előtt még számos további folyamaton kell keresztülmennie, mire a célállatban vakcinaként felhasználható lesz. Közelebbi célnak tűnik a fehérjék nagy mennyiségű termelése nagy fehérjetartalmú, egész növényekben, majd kivonás, tisztítás és megfelelő gyógyszerformára alakítás után az oltóanyagként történő felhasználás. Ehhez képest távolabbi lehetőség, mire a nyersen fogyasztható termésekben, gyümölcsökben, levelekben, gyökérgumókban annyira szigorúan irányítható expresszió kidolgozottá válik, hogy kivonás és tisztítás nélkül olyan állandó és szabályozott mennyiségben legyen jelen az antigén, ami megfelelő immunválaszt indukál (43).

Mindezekből kitűnik, hogy a növények vakcinagyártási célra történő alkalmazása technikai akadályokat ma már nem jelent. Több megfelelően kidolgozott módszer is rendelkezésre áll az antigének irányított szintézisére, és ha szükséges, akkor az antigén megfelelő módon kiegészíthető az immunválasz számára szükséges jelzésekkel is. Kísérletek bizonyítják ezeknek a rendszereknek az életképességét, az így készült vakcinák hatékonyságát és versenyképességét a hagyományos vagy a más rendszerekre épülő új generációs vakcinákkal.

Köszönetnyilvánítás

A téma feldolgozása az OTKA-NKTH 78317 – 78675 – 78608 konzorciumi pályázat támogatásával készült.

IRODALOM

1. ATHMARAM, T. N. – BALI, G. – DEVAIAH, K. M.: Integration and expression of Bluetongue VP2 gene in somatic embryos of peanut through particle bombardment method. *Vaccine*, 2006. 24. 2994–3000.
2. AZIZ, M. A. – SINGH, S. et al.: Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002. 299. 345–351.
3. BINNS, A. N.: T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. *Trends Plant Sci.*, 2002. 7. 231–233.
4. CARRILLO, C. – WIGDOROVITZ, A. et al.: Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J. Virol.*, 1998. 72. 1688–1690.
5. CASTAÑÓN, S. – MARÍN, M. S. et al.: Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Virol.*, 1999. 73. 4452–4455.
6. CHICHESTER, J. A. – MUSYCHUK, K. et al.: Immunogenicity of a subunit vaccine against *Bacillus anthracis*. *Vaccine*, 2007. 25. 3111–3114.
7. CHILTON, M. D. – DRUMMOND, M. H. et al.: Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 1977. 2. 263–271.
8. DALSGAARD, K. – UTTENTHAL, A. et al.: Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat. Biotechnol.*, 1997. 15. 248–252.
9. DUS SANTOS, M. J. – WIGDOROVITZ, A. et al.: A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine*, 2002. 20. 1141–1147.
10. FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R. – MARTÍNEZ-TORRECUDRADA, J. L. et al.: Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett.*, 1998. 427. 229–235.
11. FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R. – MOURIÑO, M. et al.: Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology*, 2001. 280. 283–291.
12. GIRARD, A. – SARON, W. et al.: Flagellin produced in plants is a potent adjuvant for oral immunization. *Vaccine*, 2011. 29. 6695–6703.
13. GLEBA, Y. – KLIMYUK, V. et al.: Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 2005. 23. 2042–2048.
14. GÓMEZ, N. – CARRILLO, C. et al.: Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology*, 1998. 249. 352–358.
15. GÓMEZ, N. – WIGDOROVITZ, A. et al.: Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch. Virol.*, 2000. 145. 1725–1732.
16. GORANTALA, J. – GROVER, S. et al.: A plant based protective antigen [PA(dIV)] vaccine expressed in chloroplasts demonstrates protective immunity in mice against anthrax. *Vaccine*, 2011. 29. 4521–4533.
17. GUERRERO, G. G. – MORENO-FIERROS, L.: Carrier potential properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins for a diphtheria toxin epitope. *Scand. J. Immunol.*, 2007. 66. 610–618.
18. HOEKEMA, A. – HIRSCH, P. R. et al.: A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 1983. 303. 179–180.
19. HU, J. – NI, Y. et al.: Immunogenicity study of plant-made oral subunit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vaccine*, 2012. 30. 2068–2074.
20. KANG, T. J. – KANG, K. H. et al.: High-level expression of the neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus by a tobacco mosaic virus-based vector. *Protein Expr. Purif.*, 2004. 38. 129–135.
21. KAPILA, J. – DE RYCKE, R. et al.: An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.*, 1997. 122. 101–108.
22. KHANDELWAL, A. – SITA, G. L. – SHAILA, M. S.: Expression of hemagglutinin protein of rinderpest virus in transgenic tobacco and immunogenicity of plant-derived protein in a mouse model. *Virology*, 2003. 308. 207–215.
23. KHANDELWAL, A. – SITA, G. L. – SHAILA, M. S.: Oral

- immunization of cattle with hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut induces specific immune responses. *Vaccine*, 2003. 21. 3282–3289.
24. KHAYAT, R. – BRUNN, N. et al.: The 2.3-Angstrom structure of Porcine circovirus 2. *J. Virol.*, 2011. 85. 7856–7862.
 25. KLEIN, T. M. – WOLF, E. D. et al.: High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 1987. 327. 70–73.
 26. KOPROWSKI, H. – YUSIBOV, V.: The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*, 2001. 19. 2735–2741.
 27. LANGEVELD, J. P. – BRENNAN, F. R. et al.: Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine*, 2001. 19. 3661–3670.
 28. LEE, R. W. – STROMMER, J. et al.: Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect. Immun.*, 2001. 69. 5786–5793.
 29. LICCIARDI, P. V. – UNDERWOOD, J. R.: Plant-derived medicines: a novel class of immunological adjuvants. *Int. Immunopharmacol.*, 2011. 11. 391–398.
 30. MARILLONNET, S. – THOERINGER, C. et al.: Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.*, 2005. 23. 718–723.
 31. MARCONI, G. – ALBERTINI, E. et al.: In plant production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X. *BMC Biotechnol.*, 2006. 6. 29.
 32. MASON, H. S. – WARZECHA, H. et al.: Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.*, 2002. 8. 324–329.
 33. MATSUMURA, T. – ITCHODA, N. – TSUNEMITSU, H.: Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch. Virol.*, 2002. 147. 1263–1270.
 34. MCGARVEY, P. B. – HAMMOND, J. et al.: Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology*, 1995. 13. 1484–1487.
 35. MODELSKA, A. – DIETZSCHOLD, B. et al.: Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95. 2481–2485.
 36. NELSON, G. – MARCONI, P. et al.: Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: A candidate antigen for new generation of veterinary vaccines. *Vaccine*, 2012. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.04.068
 37. NICHOLAS, B. L. – BRENNAN, F. R. et al.: Characterization of the immune response to canine parvovirus induced by vaccination with chimaeric plant viruses. *Vaccine*, 2002. 20. 2727–2734.
 38. OSZVALD, M. – KANG, T. J. – TÖMÖSKÖZI, S. – TAMÁS, C. – TAMÁS, L. – KIM, T. G. – YANG, M. S.: Expression of a synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin in rice endosperm. *Mol. Biotechnol.*, 2007. 35. 215–223.
 39. PEREA ARANGO, I. – LOZA RUBIO, E. et al.: Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Rep.*, 2008. 27. 677–685.
 40. PÉREZ FILGUEIRA, D. M. – ZAMORANO, P. I. et al.: Bovine herpes virus gD protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity. *Vaccine*, 2003. 21. 27–30.
 41. PRASAD, V. – SATYAVATHI, V. V. et al.: Expression of biologically active Hemagglutinin-neuraminidase protein of Peste des petits ruminants virus in transgenic pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Plant Sci.*, 2004. 166. 199–205.
 42. RAO, A. Q. – BAKHSH, A. et al.: The myth of plant transformation. *Biotechnol. Adv.*, 2009. 27. 753–763.
 43. RYBICKI, E. P.: Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol. J.*, 2010. 8. 620–637.
 44. SANFORD, J. C. – KLEIN, T. M. et al.: Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Part. Sci. Technol.*, 1987. 5. 27–37.
 45. SATYAVATHI, V. V. – PRASAD, V. et al.: Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] plants. *Plant Cell Rep.*, 2003. 21. 651–658.
 46. SORIA-GUERRA, R. E. – MORENO-FIERROS, L. – ROSALES-MENDOZA, S.: Two decades of plant-based candidate vaccines: a review of the chimeric protein approaches. *Plant Cell Rep.*, 2011. 30. 1367–1382.
 47. SOROKIN, A. P. – KE, X. et al.: Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant. Sci.*, 2000. 156. 227–233.
 48. SPANGLER, B. D.: Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.*, 1992. 56. 622–647.
 49. STREATFIELD, S. J.: Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods*, 2006. 38. 150–157.
 50. TACKET, C. O.: Plant-based oral vaccines: results of human trials. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2009. 332. 103–117.
 51. TIWARI, S. – MISHRA, D. K. et al.: High level expression of a functionally active cholera toxin B: rabies glycoprotein fusion protein in tobacco seeds. *Plant Cell Rep.*, 2009. 28. 1827–1836.
 52. TIWARI, S. – VERMA, P. C. et al.: Plants as bioreactors

- for the production of vaccine antigens. *Biotechnol. Adv.*, 2009. 27. 449–467.
53. TREGONING, J. S. – NIXON, P. et al.: Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res.*, 2003. 31. 1174–1179.
 54. TUBOLY, T. – YU, W. – BAILEY, A. – DEGRANDIS, S. – DU, S. – ERICKSON, L. – NAGY, É.: Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, 2000. 18. 2023–2028.
 55. UCHIDA, M. – LI, X. W. et al.: Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. 1790. 754–764.
 56. USHA, R. – ROHLL, J. B. et al.: Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology*, 1993. 197. 366–374.
 57. VAN DEN AKKER, F. – PIZZA, M. et al.: Crystal structure of a non-toxic mutant of heat-labile enterotoxin, which is a potent mucosal adjuvant. *Protein Sci.*, 1997. 6. 2650–2654.
 58. VITTI, A. – PIAZZOLLA, G. et al.: Cucumber mosaic virus as the expression system for a potential vaccine against Alzheimer's disease. *J. Virol. Methods*, 2010. 169. 332–340.
 59. VOINET, O. – RIVAS, S. et al.: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.*, 2003. 33. 949–956.
 60. WANG, Y. – DENG, H. et al.: Generation and immunogenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed in transgenic rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009. 380. 292–297.
 61. WARZECHA, H. – MASON, H. S.: Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *J. Plant. Physiol.*, 2003. 160. 755–764.
 62. WIGDOROVITZ, A. – PÉREZ FILGUEIRA, D. M. et al.: Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology*, 1999. 264. 85–91.
 63. WIGDOROVITZ, A. – MOZGOVOI, M. et al.: Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *J. Gen. Virol.*, 2004. 85. 1825–1832.
 64. XU, J. – DOLAN, M. C. et al.: Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.*, 2011. DOI.: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.020.
 65. YANG, C. D. – LIAO, J. T. et al.: Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnol.*, 2007. 7. 62.
 66. YANG, Z. Q. – LIU, Q. Q. et al.: Expression of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 2007. 25. 591–598.
 67. YUSIBOV, V. – HOOPER, D. C. et al.: Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*, 2002. 20. 3155–3164.
 68. ZAENEN, I. – VAN LAREBEKE, N. et al.: Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.*, 1974. 86. 109–127.
 69. ZHOU, J. Y. – CHENG, L. Q. et al.: Generation of the transgenic potato expressing full-length spike protein of infectious bronchitis virus. *J. Biotechnol.*, 2004. 111. 121–130.

Közlésre érke.: 2012. aug. 16.

■ HÍR

Rohamosan terjed a schmallerbergvírus.

Először 2011 novemberében izolálták a vírust Németországban. Azóta 11 európai államban terjedt el. Németországban már minden tartományban jelentkezett a fertőzés, összesen 1844 állományban állapították meg. A fertőzöttség a szarvasmarha-állományokban gyakoribb, mint juhállományokban. Svájcban csak 2012 júniusában állapították meg az első esetet, azóta a 138 vizsgált állományból 135-ben találtak ellenanyagokat. Az osztrák monitoring vizsgálat a szarvasmarha-állományok 89%-át találta fertőzöttnek. A robbanásszerű terjedés oka ugyanaz, mint a kéknyelvbetegség esetében: a vírust vérszívó szúnyogok terjesztik. A fertőzöttség már korábban Európában lehetett, de a nem specifikus tünetek (tejcsökkenés, láz, hasmenés) miatt rejtve maradt. A viraemia rövid ideig (1–6 napig) tart csak, a klinikai tünetek is gyorsan elmúlnak. A tüneteket eddig

szarvasmarhákon állapították meg, a kiskérődzők nem mutatnak tüneteket a heveny fertőzés idején. Magzatkárosodás vagy vetélés csak akkor következik be, ha a juhok a vemhesség 4–8., a szarvasmarhák a 8–14. hetében fertőződnek. A víruskimutatás (real-time PCR) a heveny szakban a szérumból vagy EDTA-próbával lehetséges, vetélt magzatok esetében leginkább az agyvelőből vagy az amnionfolyadékából vett mintából lehet sikeres. Az ellenanyagok kimutatására vérszérumból az immunfluoreszcens vagy az ELISA-próba használatos, az EDTA-próba kevésbé sikeres. Hatékony gyógykezelés nem ismeretes és nincs vakcina sem. Megelőzésre javasolják a szúnyogirtást és az állatok repellens szerrel történő kezelését. A magzatkárosítás megelőzésére a vektortmentes időben történő termékenyítés is szóba jöhet. [*VETimpulse*, 2012. 21. (20.) 7. –VIL–]